

PCT/JP2004/008707

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

21. 6. 2004

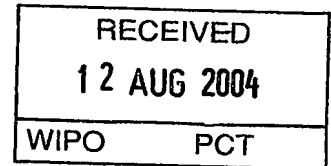
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 8月19日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-295153
[ST. 10/C]: [JP2003-295153]

出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人 科学技術振興機構

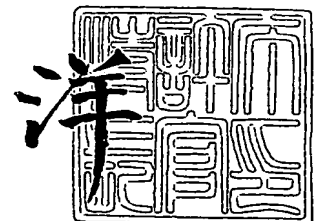


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 7月30日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特2004-3067584

【書類名】 特許願
【整理番号】 PA905337
【提出日】 平成15年 8月19日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県茅ヶ崎市赤松町 7-57-517
 【氏名】 三原 久和
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県厚木市長谷 1113
 【氏名】 高橋 剛
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区有馬 8-6-1
 【氏名】 大島 秀夫
【特許出願人】
 【識別番号】 396020800
 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
【代理人】
 【識別番号】 100102668
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 佐伯 憲生
 【電話番号】 03-5205-2521
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 039251
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0013044

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

アミロイド β ペプチドの14残基から23残基からなるペプチド〔以下、A β （14-23）と略す。〕又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドを含んでなる、アミロイド β 蛋白質のアミロイド線維化を増幅するための試薬。

【請求項2】

A β （14-23）の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドが、更に、ペプチド鎖内部の疎水性残基の1乃至複数個が他の疎水性アミノ酸残基に置換されてなるペプチドである、請求項1に記載の試薬。

【請求項3】

A β （14-23）の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドが、更に、ペプチド鎖内部の疎水性残基が全てLeuに置換されるか、ペプチド鎖内部の疎水性部位のN末端側から3残基目或いは4残基目のPheを残して全てLeuに置換されるか、又は疎水性部位のN末端側から3残基目がAlaに置換され、残りの疎水性残基が全てLeuに置換されてなるペプチドである、請求項1に記載の試薬。

【請求項4】

アミロイド β ペプチドの14残基から23残基からなるペプチド〔A β （14-23）〕又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドを含んでなる試薬を用いることを特徴とする、アミロイド β 蛋白質のアミロイド線維化増幅方法。

【請求項5】

A β （14-23）の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドが、更に、ペプチド鎖内部の疎水性残基の1乃至複数個が他の疎水性アミノ酸残基に置換されてなるペプチドである、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

A β （14-23）の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドが、更に、ペプチド鎖内部の疎水性残基が全てLeuに置換されるか、ペプチド鎖内部の疎水性部位のN末端側から3残基目或いは4残基目のPheを残して全てLeuに置換されるか、又は疎水性部位のN末端側から3残基目がAlaに置換され、残りの疎水性残基が全てLeuに置換されてなるペプチドである、請求項4に記載の方法。

【請求項7】

アミロイド β ペプチドの14残基から23残基からなるペプチド〔A β （14-23）〕又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドを含んでなる、アミロイドーシスに起因する疾病の検出用試薬。

【請求項8】

A β （14-23）の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドが、更に、ペプチド鎖内部の疎水性残基の1乃至複数個が他の疎水性アミノ酸残基に置換されてなるペプチドである、請求項7に記載の検出用試薬。

【請求項9】

A β （14-23）の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドが、更に、ペプチド鎖内部の疎水性残基が全てLeuに置換されるか、ペプチド鎖内部の疎水性部位のN末端側から3残基目或いは4残基目のPheを残して全てLeuに置換されるか、又は疎水性部位のN末端側から3

残基目が A l a に置換され、残りの疎水性残基が全て L e u に置換されてなるペプチドである、請求項 7 に記載の検出用試薬。

【請求項 10】

アミロイドーシスに起因する疾病がアルツハイマー病である請求項 7 ～ 9 の何れかに記載の検出用試薬。

【請求項 11】

アミロイド β ペプチドの 14 残基から 23 残基からなるペプチド [A β (14-23)] 又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全て L y s に置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全て G l u に置換された形のペプチドを含んでなる試薬を用いることを特徴とする、アミロイドーシスに起因する疾病の検出方法。

【請求項 12】

A β (14-23) の正電荷側鎖アミノ酸が全て L y s に置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全て G l u に置換された形のペプチドが、更に、ペプチド鎖内部の疎水性残基の 1 乃至複数個が他の疎水性アミノ酸残基に置換されてなるペプチドである、請求項 11 に記載の検出方法。

【請求項 13】

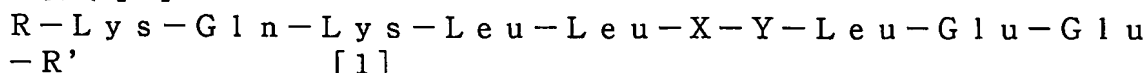
A β (14-23) の正電荷側鎖アミノ酸が全て L y s に置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全て G l u に置換された形のペプチドが、更に、ペプチド鎖内部の疎水性残基が全て L e u に置換されるか、ペプチド鎖内部の疎水性部位の N 末端側から 3 残基目或いは 4 残基目の P h e を残して全て L e u に置換されるか、又は疎水性部位の N 末端側から 3 残基目が A l a に置換され、残りの疎水性残基が全て L e u に置換されてなるペプチドである、請求項 11 に記載の検出方法。

【請求項 14】

アミロイドーシスに起因する疾病がアルツハイマー病である請求項 11 ～ 13 の何れかに記載の検出方法。

【請求項 15】

下記一般式 [1]



(式中、R は、水素原子又はアミノ基の保護基を表し、X は、L e u、P h e 又は A l a を表し、Y は、L e u 又は P h e を表し、R' は、OH 又は NH₂ を表す。) で示されるペプチド。

【請求項 16】

式: R-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Glu-Glu-R' (式中、R 及び R' は前記と同じ。) で示される請求項 15 に記載のペプチド。

【請求項 17】

式: R-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Leu-Phe-Leu-Glu-Glu-R' (式中、R 及び R' は前記と同じ。) で示される請求項 15 に記載のペプチド。

【請求項 18】

式: R-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Phe-Leu-Leu-Glu-Glu-R' (式中、R 及び R' は前記と同じ。) で示される請求項 15 に記載のペプチド。

【請求項 19】

式: R-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Glu-Glu-R' (式中、R 及び R' は前記と同じ。) で示される請求項 15 に記載のペプチド。

【書類名】明細書

【発明の名称】アミロイド β 蛋白質のアミロイド線維化を増幅するための試薬

【技術分野】

【0001】

本発明は、アミロイド線維化したアミロイド β 蛋白質（以下、 $A\beta$ と略す。）の増幅方法とそのための試薬に関するもので、アルツハイマー病やプリオン病等のアミロイドーシスの予兆診断法の基盤となるものである。

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病は1907年にドイツの神経病理学者Alois Alzheimerによって報告された疾患である。発症年齢は初老以降であり、進行性の痴呆が症状の中核となる疾患である。痴呆とは正常であった知的機能が徐々に障害された結果、日常生活に障害をきたしてくる状態をいう。アルツハイマー病の場合に症状として最初に現れてくるものは、物忘れに代表されるような記憶力の障害である。さらに、失語、失認、失行などを含む様々な知的機能の障害も加わり、徐々に進行性の経過をとり、末期には寝たきり、失禁など高度の痴呆状態へと至る。病理学的には脳のび慢性の萎縮と神経細胞の脱落に加え、老人斑、神経原線維変化と呼ばれる特徴的な構造物が数多く観察される。これらの変化は特に海馬において著しい傾向にある。

神経原線維変化はAlzheimerが初めて記載した変化で、神経細胞全体の嗜銀性の線維状構造物の蓄積を指す。その線維は特徴的な二重らせん構造をとっていることからPaired helical filaments (PHF)と名付けられた。しかしPHFは多くの神経疾患で出現することが発見されたことから、現在ではPHFの形成は神経細胞が変性していく過程における非特異的な反応様式であると考えられている。

老人斑は元来、中心に密集したアミロイド線維があり、その周囲に変成しつつある神経突起、アストロサイトなどが集まった構造全体を定義していた。アミロイド線維は種々の溶媒に不溶であるので、この性質を利用してアルツハイマー病脳の髄膜血管および脳実質から精製され、その構成成分が分子量約4 kDの新しいペプチドであるアミロイド β 蛋白質($A\beta$)と同定された。分子量が小さいことからその前駆体の存在が予測され、cDNAクローニングによりAPP(β Amyloid protein precursor)が同定された。これは一回膜貫通型の膜蛋白質であり、 $A\beta$ はAPPの細胞外ドメインから膜ドメインの内部2残基までであることが判った。

その後、単離された $A\beta$ から抗 $A\beta$ 抗体が作製され、アルツハイマー病患者の脳を抗体染色したところ、以前から知られていた球状の老人斑の他に多くの形態での $A\beta$ の存在が観察され、アミロイド沈着はこれまでの考えよりも遙かに広範に渡っていることが明らかとなった。アミロイド沈着のなかにはその程度が軽く、変成神経突起を伴わないものがある。これはび慢性老人斑と名付けられ、アルツハイマー病の初期病理像であると考えられ、アルツハイマー病に特異的なものとして広く支持されている。

近年、アルツハイマー病やプリオン病などの致死性のアミロイドーシス(amyloidosis: アミロイドが細胞周囲や組織間隙に沈着し機能障害をおこす疾患)において、蛋白質のミスフォールド体形成やアミロイド線維形成が重要な段階であることが明らかになりつつあり、アミロイド線維を検出することはアミロイドーシスの診断において極めて重要である。

【0003】

$A\beta$ とはアミノ酸40残基もしくは42残基で構成されるペプチドで、それぞれ $A\beta$ (1-40)および $A\beta$ (1-42)と呼ばれ、アルツハイマー病の発症過程において重要な役割を果たしていると考えられている。 $A\beta$ はアミノ酸695残基から770残基で構成される一回膜貫通蛋白質であるAPPから酵素(β -secretase, γ -secretase)によって切り出されて生成し、健康な人の脳内には0.1 nM~10 nM程度の濃度でモノマーの $A\beta$ (1-40)が存在しているとされ、 α -secretaseによって分解され代謝される。

A β (1-40) は生理的条件下においてランダムコイル状態で存在し、A β (1-40) が生成する場合は脳内に沈着することなく α -secretase によって代謝される。しかし A β (1-42) は生理的条件下において、ランダムコイル状態から集合化して α -ヘリックス構造を経由し β シート構造をとる。その後 β シート構造の A β は更に重合しアミロイド線維化してプロテアーゼ耐性を獲得する。そして不溶化して脳内に沈着し老人斑を形成する。このことがアルツハイマー病発症過程において重要であると考えられている。しかし A β (1-42) は稀にしか生成せず、その生成機構およびアミロイド線維化の機構も良く判っていない。

【0004】

アルツハイマー病の診断は、初期段階では DSM-4 (米国精神医学協会から公示されたアルツハイマー病の診断基準) 等を用いた精神医学的な手法が大部分を占めている。しかし精神医学的な手法ではアルツハイマー病初期段階における確定診断が難しく、またアルツハイマー病患者およびその家族がその症状に気付く頃にはその病状がかなり進行していることが多い。また、中期段階以降は MRI により脳の萎縮を判定することで診断が可能だが、ごく初期段階においては脳の萎縮が始まっていないので診断することは難しい。

またその他の診断法として低濃度のトロピカミド (アセチルコリン受容体アンタゴニスト; アルツハイマー病患者はアセチルコリン受容体が減少するのでアセチルコリン受容体アンタゴニストに対して過敏になる) 点眼に対する瞳孔の散大、および固視による記憶力テスト (アルツハイマー病においては海馬の損傷が著しく、それをテストする) などがあるが、現時点では信頼性が低く、副次的な診断法としてしか用いられていない。現時点では、ごく初期段階のアルツハイマー病の診断は非常に難しく、そのことがアルツハイマー病の治療をより一層困難なものとしている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

A β のアミロイド線維沈着はアルツハイマー病に特異的であり、アルツハイマー病の他の症状に先行するので、アルツハイマー病のごく初期段階においてアミロイド線維化した A β を検出することが可能となれば、アルツハイマー病の初期段階の確定診断が可能になると考えられる。しかし、アルツハイマー病の初期段階において、アミロイド線維化した A β はごく微量であるため、現時点では検出が困難である。そこで、微量のアミロイド線維化した A β を増幅することが可能となれば、初期段階でのアルツハイマー病検出に多大な応用が期待される。

本発明は、斯かる状況に鑑みなされたもので、アミロイド線維化した微量の A β の核とテンプレート反応を起こしてアミロイド線維を形成し、線維を増量して増幅する天然ペプチドの探索、並びにそれに代り得る新たな人工ペプチドの設計、開発と、これらを用いたアミロイド β 蛋白質のアミロイド線維化増幅方法及びそれに用いる試薬、並びにアミロイドーシスに起因する疾病の検出方法及びそれに用いる試薬を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、アミロイド β ペプチドの 14 残基から 23 残基からなるペプチド [以下、A β (14-23) と略す。] 又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全て Lys に置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全て Glu に置換された形のペプチドを含んでなる、アミロイド β 蛋白質のアミロイド線維化を増幅するための試薬に関する。

【0007】

また、本発明は、アミロイド β ペプチドの 14 残基から 23 残基からなるペプチド [A β (14-23)] 又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全て Lys に置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全て Glu に置換された形のペプチドを含んでなる試薬を用いることを特徴とする、アミロイド β 蛋白質のアミロイド線維化増幅方法に関する。

【0008】

更に、本発明は、アミロイド β ペプチドの 14 残基から 23 残基からなるペプチド [A

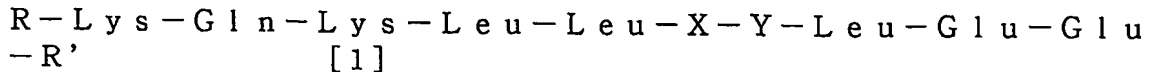
β (14-23)] 又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドを含んでなる、アミロイドーシスに起因する疾病の検出用試薬に関する。

【0009】

更にまた、本発明は、アミロイド β ペプチドの14残基から23残基からなるペプチド[A β (14-23)] 又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドを含んでなる試薬を用いることを特徴とする、アミロイドーシスに起因する疾病の検出方法に関する。

【0010】

また、本発明は、下記一般式[1]



(式中、Rは、水素原子又はアミノ基の保護基を表し、Xは、Leu、Phe又はAlaを表し、Yは、Leu又はPheを表し、R'は、OH又はNH₂を表す。)で示されるペプチドに関する。

【発明の効果】

【0011】

本発明に係る、アミロイドーシスに起因する疾病の検出用試薬によれば、体内にあるアミロイド線維の核を安全な人工ペプチドを利用して増幅し、検出不可能な原因蛋白質を予兆段階の検査において増幅して検出可能なレベルにすることが出来るので、アルツハイマー病やプリオン病(狂牛病やヒトのヤコブ病など)等のアミロイドーシスに起因する疾病を初期段階で検出することが出来る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明において用いられる、A β (14-23)としては、天然のものでも、ペプチド合成法の常法に従って合成したものでも何れでも良い。

本発明において用いられる、A β (14-23)の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドとしては、例えば、A β (14-23)の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドであって、更にペプチド鎖内部の疎水性残基の1乃至複数個が他の疎水性アミノ酸残基に置換されてなるペプチドが、好ましいものとして挙げられる。置換し得る他の疎水性アミノ酸残基としては、例えば、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)、フェニルアラニン(Phe)、バリン(Val)等のアミノ酸残基が挙げられる。

そのようなペプチドの好ましい具体例としては、例えば、A β (14-23)の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドであって、更に、i) ペプチド鎖内部の疎水性残基が全てLeuに置換された形のもの、ii) ペプチド鎖内部の疎水性部位のN末端側から3残基目或いは4残基目のPheを残して全てLeuに置換された形のもの、或いは、iii) 疎水性部位のN末端側から3残基目がAlaに置換され、残りの疎水性残基が全てLeuに置換された形のもの等が挙げられるが、勿論これらに限定されるものではない。

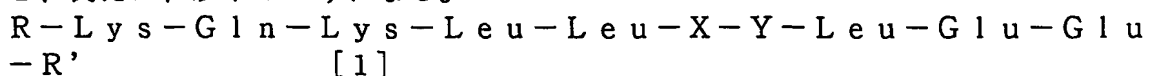
【0013】

本発明に係る、アミロイド β 蛋白質のアミロイド線維化を増幅するための試薬、及び本発明に係る、アミロイドーシスに起因する疾病の検出用試薬は、上記した如きA β (14-23) 又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドを含んでなる点に特徴を有する。

また、本発明に係る、アミロイド β 蛋白質のアミロイド線維化増幅方法、及び本発明に係る、アミロイドーシスに起因する疾病の検出方法は、上記した如きA β (14-23) 又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドを含んでなる試薬を用いる点に特徴を有する。

【0014】

本発明に係る、 $A\beta$ (14-23) の正電荷側鎖アミノ酸が全て Lys に置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全て Glu に置換された形のペプチドの好ましい具体例を一般式で示すと、例えば、以下のようになる。



(式中、 R は、水素原子又はアミノ基の保護基を表し、 X は、 Leu 、 Phe 又は Ala を表し、 Y は、 Leu 又は Phe を表し、 R' は、 OH 又は NH_2 を表す。)

【0015】

上記一般式 [1] で示されるペプチドの好ましい具体例としては、例えば、下記の如きものが挙げられる。

- 1) $R-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Glu-Glu-R'$
- 2) $R-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Leu-Phe-Leu-Glu-Glu-R'$
- 3) $R-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Phe-Leu-Leu-Glu-Glu-R'$
- 4) $R-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Glu-Glu-R'$

(上記式中の R 及び R' は前記と同じ。)

上記 1) ~ 4) に示されるペプチドは何れも新規化合物である。

【0016】

上記一般式 [1] において、 R で表されるアミノ基の保護基としては、例えば、アセチル基、 t -ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、フルオレニルメトキシカルボニル基、ベンゾイル基等のアシル基や、フルオレッセイン基、オレゴングリーン基等の蛍光性アシル基などが挙げられるが、より簡便なアセチル基が好ましい。

なお、上記 1) ~ 4) に示されるペプチドにおける R もこれと全く同様である。

【0017】

本発明において用いられる、 $A\beta$ (14-23) の正電荷側鎖アミノ酸が全て Lys に置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全て Glu に置換された形のペプチドの好ましい具体例としては、上記一般式 [1] で示されるものの他に、例えば、一般式 [1] において、 X が、ペプチド鎖内部の疎水性部位の N 末端側から 1 残基目、2 残基目、或いは 5 残基目の位置にあるものや、一般式 [1] における Leu が Ile に置き換わったもの、或いは一般式 [1] における X や Y が Ile に置き換わったもの等々が挙げられる。

【0018】

これら本発明に係るペプチド類は、何れも、ペプチド合成器を用いた Boc 固相合成法や $Fmoc$ 固相合成法等の常法により容易に合成し得る。

【0019】

本発明に係る、アミロイドーシスに起因する疾病の検出用試薬、或いはアミロイドーシスに起因する疾病の検出方法により検出可能な疾病としては、先ず第一にアルツハイマー病が挙げられる。また、例えば、狂牛病やヒトのヤコブ病などのプリオン病も同様に検出可能である。その他、アミロイドーシスに起因する各種疾病が同様に検出し得る。

これらアミロイドーシスに起因する各種疾病は、本発明に係るペプチドを含んでなる検出試薬を用いることにより、予兆段階、初期段階において、感度良く検出することが出来る。

【0020】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

【実施例 1】

【0021】

(1) ペプチドAc-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Leu-Phe-Leu-Glu-Glu-NH₂ [ペプチド(10-4F)]の合成

(1-1) 試薬、機器・装置

Fmocアミノ酸誘導体および固相担体としての樹脂は、ノババイオケム(Novabiochem)社より購入し、そのまま用いた。他の試薬は市販品のものをそのまま使用した。

ペプチドはFmoc(9-フルオレニルメトキシカルボニル)固相法により手動で合成した。ペプチド鎖の手動合成容器にはポリプロピレン製エンブティーカラム(ファルマシアバイオテック社製)を用いた。吸収スペクトルは、SHIMADZU BioSpc-1600 Spectrometerを用いて測定した。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)には、HITACHI 7000 systemを用いた。HPLC溶媒として、A液:0.1%TFA/H₂O、B液:0.08%TFA/CH₃CNの混合溶媒を用い、30分間でA液とB液の直線勾配により溶出した。逆相カラムとして分析にはCosmosil 5C18-AR-2(Nacalai tesque)(4.6×150 mm)を流速1ml/minで使用した。ペプチドの精製にはCosmosil 5C18-AR-2(ナカライ テスク)(10×250 mm)を流速3ml/minを使用した。検出波長には220nmを用いた。飛行時間型質量分析(TOF-MS)はSHIMADZU KRATOS MALDI IIIを用いて行い、マトリックスとして3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシ桂皮酸(シナピン酸)を用いた。蛍光プレートリーダーは、BERTHOLD Twinkle LB970を用いた。

【0022】

(1-2) ペプチド(10-4F)の合成

10-4Fの合成はFmoc固相法により20μmolスケールで行った。樹脂はNovasyn TGR resinを用いた。各アミノ酸残基のカップリングは樹脂上のアミノ基に対して3当量のFmoc-アミノ酸(Fmoc-AA-OH)を用いて反応を完全に進行させるようにした。本実施例ではFmoc-AA-OHとしてFmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Phe-OH、(t-Bu:tert-ブチル、Trt:トリチル、Boc:tert-ブトキシカルボニル)を使用した。カップリング試薬として、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU)(3当量)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(HOBt-H₂O)(3当量)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)(6当量)を用いた。反応溶媒としてN-メチルピロリドン(NMP)を使用した。Fmoc基の除去には20%ピペリジン(PPD)/NMPを使用した。アミノ酸誘導体をカルボキシル末端から順次カップリングした。反応中は適宜ボルテックスで攪拌し、カップリングの終了をKaiser Test(KT)により確認した。全てのアミノ酸をカップリング後、アミノ末端のアミノ酸のFmoc基を除去した後、NMP中で無水酢酸(10等量)を用いてペプチドのN末端のアミノ基をアセチル化した。その後、樹脂をNMP、クロロホルムで順次洗浄し、4時間減圧乾燥した。

減圧乾燥した樹脂を50mlナスフラスコに取り、m-クレゾール(0.13ml)、チオアニソール(0.38ml)及びトリフルオロ酢酸(TFA)(5ml)を順次加え室温で1時間攪拌し反応させた。エバポレーターを用いてTFAを除去した後、約30mlのジエチルエーテルを加えてペプチド(10-4F)を沈殿させた。遠心分離器(3000rpm、5分)にかけデカンテーションを5回繰り返した後、ジエチルエーテルを窒素気流下で気化させた。沈殿を減圧乾燥し、粗ペプチド(10-4F)を得た。得られた粗ペプチド(10-4F)を逆相HPLCにより精製し、CH₃CNをエバポレーターで除去した後、凍結乾燥し回収した。収率35%。得られたペプチド(10-4F)はMALDI-TOFMSを用いて同定した。

MALDI-TOFMS:

実測値(M+H⁺)1301.6。

計算値 ($M+H^+$) 1302.5。

【0023】

(2) ペプチド $Ac-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Glu-Glu-NH_2$ [ペプチド (10-3L)]、ペプチド $Ac-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Phe-Leu-Leu-Glu-Glu-NH_2$ [ペプチド (10-3F)] 及びペプチド $Ac-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Glu-Glu-NH_2$ [ペプチド (10-3A)] の合成。

上記 (1) で用いたと同じ試薬及び機器・装置を用い、上記 (1) に記載の方法と同様の方法でペプチド合成及び逆相HPLCによる精製を行ない、ペプチド (10-3L)、ペプチド (10-3F) 及びペプチド (10-3A) をそれぞれ合成した。

得られた、これらペプチドのMALDI-TOFMSを以下に示す。

ペプチド (10-3L) : 実測値 ($M+H^+$) 1290.1

計算値 ($M+H^+$) 1290.6

ペプチド (10-3F) : 実測値 ($M+H^+$) 1302.2。

計算値 ($M+H^+$) 1302.5。

ペプチド (10-3A) : 実測値 ($M+Na^+$) 1226.2。

計算値 ($M+Na^+$) 1226.5。

【0024】

(3) $A\beta$ (14-23) 及び $A\beta$ (10-35) の合成

上記 (1) で用いたと同じ試薬及び機器・装置を用い、上記 (1) に記載の方法と同様に、アミロイド β ペプチドの14残基から23残基からなるペプチド [$A\beta$ (14-23)]、及びアミロイド線維の核として、疎水性残基に富み線維形成能が高いことが知られている、アミロイド β ペプチドの10残基から35残基からなるペプチド [$A\beta$ (10-35)] を合成した。

得られたこれらペプチドのMALDI-TOFMSを以下に示す。

$A\beta$ (14-23) : 実測値 ($M+H^+$) 1274.8

計算値 ($M+H^+$) 1274.4

$A\beta$ (10-35) : 実測値 ($M+H^+$) 2946.5

計算値 ($M+H^+$) 2945.3

本実施例で合成した各ペプチドについて、25℃でCDスペクトルの測定を行った結果を図1に示す。図1中、(1) はインキュベーション前 (= 0日)、(2) はインキュベーション (1日) 後の測定結果をそれぞれ示す。

【実施例2】

【0025】

(1) 人工ペプチド単独でのアミロイド線維形成

実施例1で合成したペプチド (10-4F)、(10-3L)、(10-3F)、(10-3A)、 $A\beta$ (14-23) 及び $A\beta$ (10-35) 単独の水溶液中でのアミロイド線維形成能を評価した。CDスペクトルを用いて二次構造を調べ、アミロイド線維に特異的に結合して蛍光を発する色素チオフラビンT (ThT) 及び透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて線維形成能を評価した。

【0026】

(1-1) CDスペクトルを用いたペプチドの二次構造測定

合成した各ペプチドについて、[ペプチド] = 2 mMのトリフルオロエタノール (TFE) 溶液を作製し、それぞれ原料溶液とした。それを20 mMトリス-HCl緩衝液 (pH 7.4) 中へと希釈し、ペプチドの終濃度を100 μ Mとして常温でインキュベートし、25℃でCDスペクトルの測定を行った (図1)。

その結果、10-4F、10-3L、10-3F及び $A\beta$ (10-35) は初めから218 nm付近に負の極大を持ち、205 nm付近に正の極大を持つ β -シート構造に特有のスペクトルを取り、更に、時間経過と共にシグナルが増大し、 β -シート性が強まったことから、アミロイド線維形成の進行が示唆された。また、10-3A及び $A\beta$ (14-

23) は何れもランダムコイル状態に特有のスペクトルを示し、経時的なスペクトルの変化は示さなかった。

人工ペプチドのうち、疎水性の低いA1aを導入したペプチドがランダムコイル状態で、それ以外のペプチドが β -シート構造をとったことから、ペプチド鎖内部の疎水性がアミロイド線維化には重要であることが示唆された。

【0027】

(1-2) ThTを用いたA β (10-35) のアミロイド線維化条件選定

ThT ($\lambda_{ex}=440\text{ nm}$ 、 $\lambda_{em}=482\text{ nm}$) を用いてA β (10-35) のアミロイド線維化を追跡し、アミロイド線維の核として用いるA β (10-35) のインキュベーション条件を選定した (図2)。

インキュベーション条件

- ・使用原料溶液: [A β (10-35)] = 2 mM TFE 溶液
- ・濃度: [A β (10-35)] = 100 μ M トリス-HCl 20 mM 溶液 (pH 7.4)
- ・温度: 室温

測定条件

- ・濃度: [A β (10-35)] = 5 μ M、[ThT] = 6 μ M (トリス-HCl 20 mM 溶液 (pH 7.4))
- ・温度: 室温
- ・攪拌条件: 試料サンプリング前にパスツールピペットで全量を十分に攪拌
セル内でパスツールピペットを用い全量を十分に攪拌
- ・励起波長: 440 nm、検出波長: 482 nm

【0028】

結果

A β (10-35) はThTの存在下で482 nm付近の蛍光強度を経時的に増大させ、グラフにプロットすると、シグモイド型の変化を示した。これは、アミロイド性タンパク質に特徴的な自己複製、自己触媒反応を示唆する。また、蛍光強度の変化が終了したサンプルをTEMを用いて観察したところ、線維が観察された (図3)。

変化は大体24時間から30時間の間に終了し、アミロイド線維化終了時の蛍光強度および終了までの時間の再現性が良好なことから、核としてこの条件で30時間以上インキュベートし、ThT存在下の蛍光強度が700~1000程度の値を示したものをA β の核として使用することとした。

【0029】

(1-3) ThTを用いた人工ペプチド単体でのアミロイド線維形成能評価

ThTを用いて、実施例1で得られた人工ペプチド単体でのアミロイド線維形成能を評価した。

インキュベーション条件

- ・使用原料溶液: [ペプチド] = 2 mM TFE 溶液
- ・濃度: [ペプチド] = 200 μ M トリス-HCl 20 mM 溶液 (pH 7.4)
- ・温度: 室温又は40℃

測定条件

- ・濃度: [ペプチド] = 5 μ M、[ThT] = 6 μ M (トリス-HCl 20 mM 溶液 (pH 7.4))
- ・温度: 室温
- ・攪拌条件: 試料サンプリング前にパスツールピペットで全量を十分に攪拌
セル内でパスツールピペットを用い全量を十分に攪拌
- ・励起波長: 440 nm、検出波長: 482 nm

【0030】

結果

(i) 室温 (常温) でインキュベーションを行った場合

人工ペプチド10-3L、10-3F、10-4Fでは時間経過と共に顕著な蛍光強度増大を示し、人工ペプチド単体でアミロイド線維を形成する能力があることが示唆された。また10-3Aはまったく蛍光強度増大を示さなかった。蛍光強度増大が終了するまでにかかった時間は10-3Lが3日間と一番短く、10-3F、10-4Fは6日間かかった。また終点での蛍光強度は、10-3Lと10-4Fが同程度で、10-3Fは、10-3L、10-4Fの半分弱だったことから、単体でのアミロイド線維形成能は10-3L、10-4Fが高く、10-3Fは低いことが判った。

各人工ペプチドの蛍光強度増大前後における蛍光強度の比較を図4に示す。

【0031】

(ii) 40℃でインキュベーションを行った場合

次に、常温では線維化が遅く、経時変化を追跡しづらいので、線維形成が早まると考えられる40℃の高温での人工ペプチド単体での線維形成能を評価した。

A β (14-23)、10-3Lは顕著に線維化終了が早まり、10-3F、10-4Fは線維化終了までの時間はほぼ変化しなかった。10-3Aはほとんど蛍光強度増大を見せなかった。また、全体的に線維化終了時の蛍光強度が低下した。

各人工ペプチドの蛍光強度増大終了時における蛍光強度の比較を図5に示す。

また、蛍光強度変化が終了した後のこれらのサンプルをTEMにより観察したところ、10-3L、10-4Fに線維が観察された(図6)。このことから、10-3L、10-4Fが線維を形成することが確認された。

【0032】

上記の結果をまとめると、殆ど全ての条件において、10-3L、10-3F、10-4Fが蛍光強度増大を示し、特に10-3L、10-4Fが顕著であることが判る。このことから、10-3Lと10-4Fは高いアミロイド線維形成能を持つことが示唆された。

また、疎水性の低いAlaを導入した10-3Aがランダムコイル状態のスペクトルを示し、ThTでも全く蛍光強度増大を示さなかったことから、ペプチド鎖内部の疎水性が β -シート構造形成およびアミロイド線維形成に際して重要であることが示唆される。

【0033】

(2) 人工ペプチドを用いた線維化A β (10-35)の線維化増幅(ThTを用いた線維化増幅の追跡)

実施例1で合成した人工ペプチドを用いてアミロイド線維化したA β (10-35)の線維化増幅を試みた。人工ペプチド溶液に上記(1-2)の条件で線維化させたA β (10-35)を少量添加し、ThTを用いて線維化増幅を追跡した。

インキュベーション条件

・使用原料溶液: [ペプチド] = 2 mM TFE溶液

・濃度: [ペプチド] = 200 μ M、[A β (10-35) (核)] = 10 μ M
(トリス-HCl 20 mM溶液 (pH 7.4))

* A β (10-35) (核)は希釈前に1時間ソニケーションし、均一化した。

・温度: 室温

測定条件

・濃度: [ペプチド] = 5 μ M、[ThT] = 6 μ M
(トリス-HCl 20 mM溶液 (pH 7.4))

・温度: 室温

・攪拌条件: 試料サンプリング前にパスツールピペットで全量を十分に攪拌
セル内でパスツールピペットを用い全量を十分に攪拌

・励起波長: 440 nm、検出波長: 482 nm

【0034】

結果

結果を図7に示す。

図7から明らかなように、ペプチド単独でのアミロイド線維形成能が高かった10-3Lと10-4Fが核存在下で顕著な蛍光強度増大を示した。特に10-3Lは室温で核を添加したものが核を添加していないものの2倍程度の蛍光強度を示したことから、核を増幅する能力が高いことが示唆される。単独でのアミロイド線維形成能が低かった10-3F及び10-3Aは核添加、核非添加両方とも蛍光強度増大を示さず、線維増幅能も線維形成能同様低いことが示唆された。

【実施例3】

【0035】

実施例2の(2)で実施した、本発明に係る人工ペプチドを用いたアミロイド線維化したA β (10-35)の線維化増幅テストを、プレートリーダーを使用して試みた。

【プレートリーダーを使用した測定】

インキュベーション条件

- ・使用原料: [ペプチド] = 5 mM DMSO溶液
- ・濃度: [ペプチド] = 20 μ M、[A β (10-35) (核)] = 2.5 μ M
(トリス-HCl 20 mM溶液 (pH 7.4))
- ・* A β (10-35) (核)は希釈前に1時間ソニケーションし、均一化した。

- ・温度: 40℃

測定条件

- ・濃度: [ペプチド] = 18 μ M、[ThT] = 25 μ M
(トリス-HCl 20 mM溶液 (pH 7.4))
- ・サンプル量: 200 μ l
- ・温度: 30℃
- ・攪拌条件: 測定前にサンプル全量をvortexで2秒間に3回
ウェル内でマイクロピペットを用い100 μ l \times 2
- ・励起波長: 440 nm、測定波長: 490 nm
- ・励起出力: 30000

【0036】

結果

結果を図8に示す。

本発明に係る人工ペプチドは、何れも核存在下で蛍光強度を増大させ、何れも30時間程度で蛍光強度増大が終了した。核非存在下では10-4Fのみ蛍光強度増大を示し、その他のペプチドは蛍光強度増大を示さなかった。この結果から、本発明に係る人工ペプチドは全て線維増幅能を持つことが判り、アミロイド線維化A β (10-35)の増幅に成功した。

線維増幅前後の蛍光強度増加度を核存在下及び非存在下について棒グラフに示した(図8)。核を添加したものの中で10-4Fがもっとも大きな蛍光強度増大を示し、10-4F、10-3L、10-3F、10-3Aの序列を示した。核を添加したもの、添加しなかったものについて蛍光強度変化終了時の差をとると10-3Lが一番大きく、以降10-4F、10-3F、10-3Aの序列を示した。核添加、非添加で蛍光強度の差が大きいほうが検出系への応用が容易であると考えられるので、線維増幅能は10-3L、10-4F、10-3F、10-3Aの序列である。

【産業上の利用可能性】

【0037】

本発明に係る人工ペプチドは、体内にあるアミロイド線維の核を増幅し、検出不可能な原因蛋白質を予兆段階の検査において増幅して検出可能なレベルにするための試薬として有用である。当該試薬を用いることによりアルツハイマー病やプリオン病(狂牛病やヒトのヤコブ病など)等のアミロイドーシスに起因する疾病を初期段階(予兆段階)で検出することが出来るので、本発明は斯業に貢献するところ極めて大なるものである。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】実施例1で合成した各ペプチドについて、25℃でCDスペクトルの測定を行った結果を示す。図1中、(1)はインキュベーション前(=0日)、(2)はインキュベーション(1日)後の測定結果をそれぞれ示す。

【図2】A β (10-35) 存在下でのThTの経時的な蛍光スペクトルの変化(A)と、482nmにおける蛍光強度のタイムコース(B)を示す。[実施例2の(1-2)]

【図3】実施例2の(1-2)において、蛍光強度の変化が終了したサンプルをTEMを用いて観察した結果を示す。

【図4】本発明に係る各ペプチド存在下でのThTの482nmにおける蛍光強度を、それぞれインキュベーション(室温)の前と後について測定、比較したものであり、□はインキュベーション前、■はインキュベーション後の結果をそれぞれ示す。[実施例2の(1-3)]

【図5】本発明に係る各ペプチド存在下でのThTの482nmにおける蛍光強度を、それぞれインキュベーション(40℃)の前と後について測定、比較したものであり、□はインキュベーション前、■はインキュベーション後の結果をそれぞれ示す。[実施例2の(1-3)]

【図6】実施例2の(1-3)において、人工ペプチド(10-3L)を用い、40℃でインキュベーションを行ない、蛍光強度変化が終了した後のサンプルをTEMにより観察した結果を示す。

【図7】本発明に係る各ペプチド存在下でのThTの482nmにおける蛍光強度を、線維化させたA β (10-35) (核)を添加、非添加のそれぞれの場合について測定、比較したものである。図7中、□は核無し(1日後)、■は核10 μ M添加(1日後)の結果をそれぞれ示す。[実施例2の(2)]

【図8】図8は、線維化させたA β (10-35) (核)を添加した場合と添加しなかった場合の、本発明に係る各ペプチド存在下でのThTの490nmにおける蛍光強度の増加の程度を示したものである。図8中、□はA β (10-35) 無添加の場合、■はA β (10-35) を添加した場合の結果をそれぞれ示す。[実施例3]

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation
<120> A reagent for amplification of amyloid fibrils formed by amyloid β protein.
<130> PA905337
<160> 5

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> SITE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa means Leu, Phe or Ala.
<220>
<221> SITE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa means Leu or Phe.

<400> 1
Lys Gln Lys Leu Leu Xaa Xaa Leu Glu Glu
1 5 10

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> exemplum of Sequence 1

<400> 2
Lys Gln Lys Leu Leu Leu Leu Leu Glu Glu
1 5 10

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> exemplum of Sequence 1

<400> 3
Lys Gln Lys Leu Leu Leu Phe Leu Glu Glu
1 5 10

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplum of Sequence 1

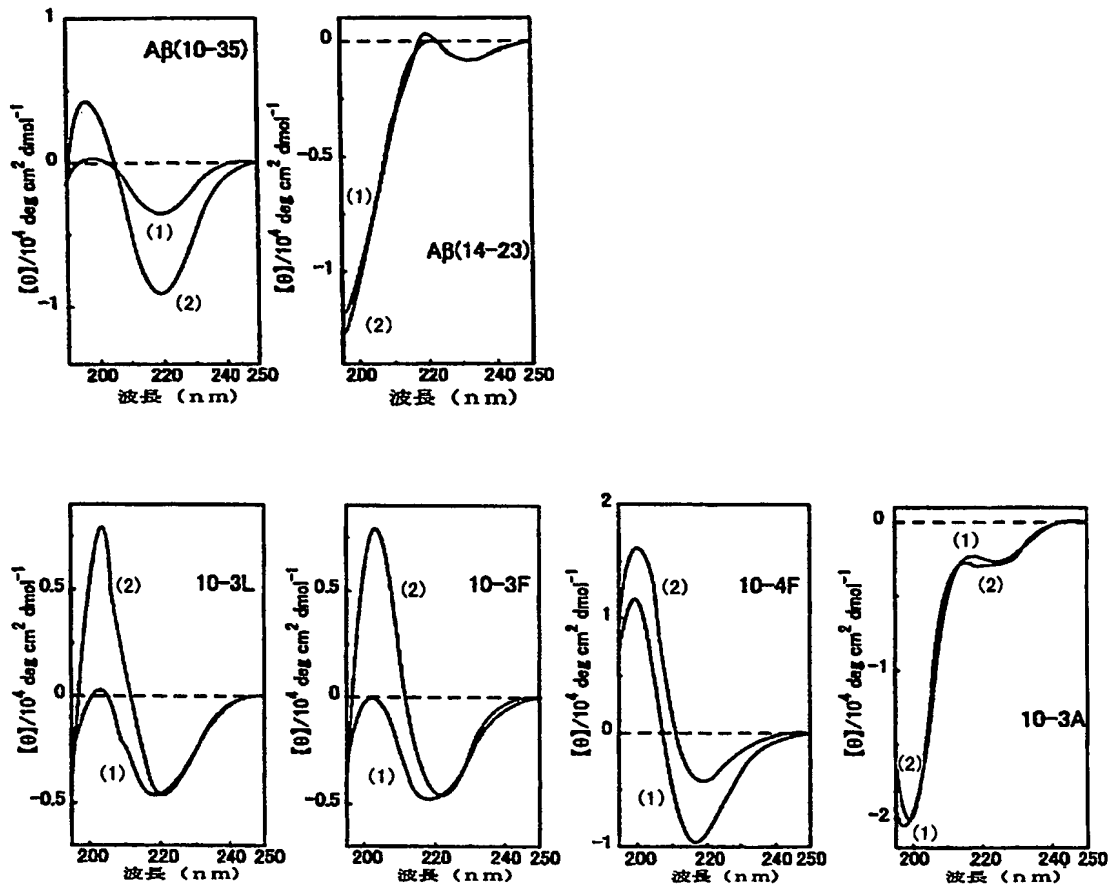
<400> 4
 Lys Gln Lys Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 1 5 10

<210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplum of Sequence 1

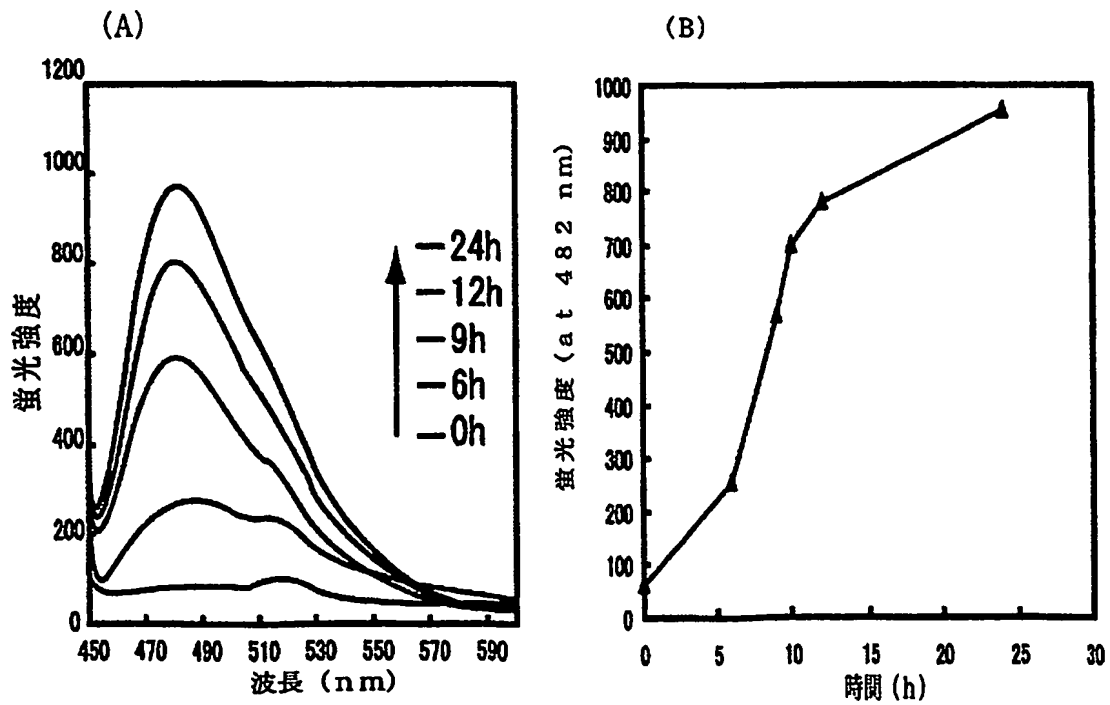
<400> 5
 Lys Gln Lys Leu Leu Ala Leu Leu Glu Glu
 1 5 10

【書類名】 図面

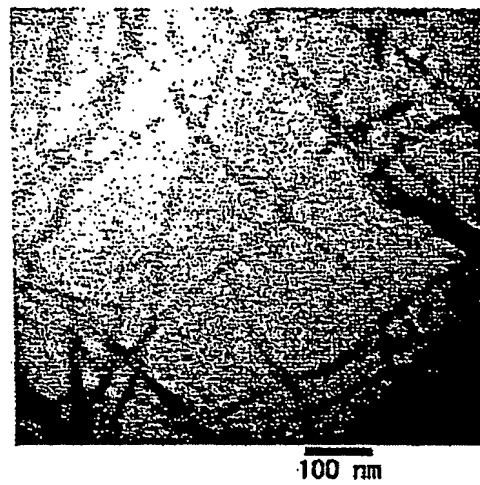
【図 1】



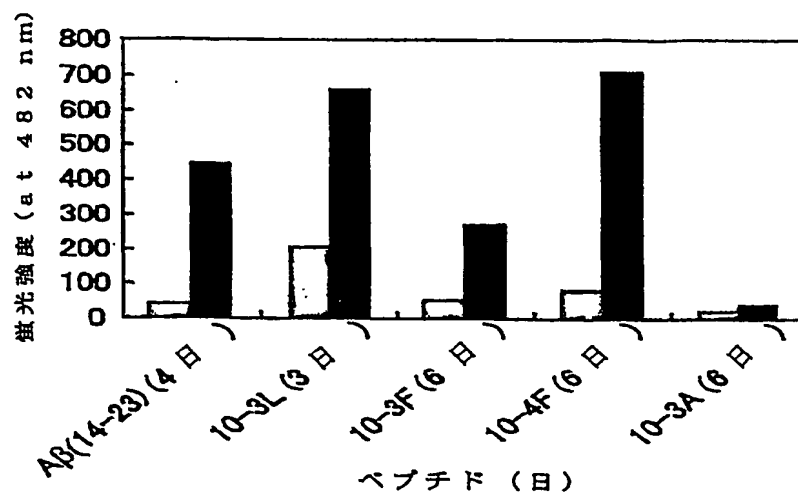
【図 2】



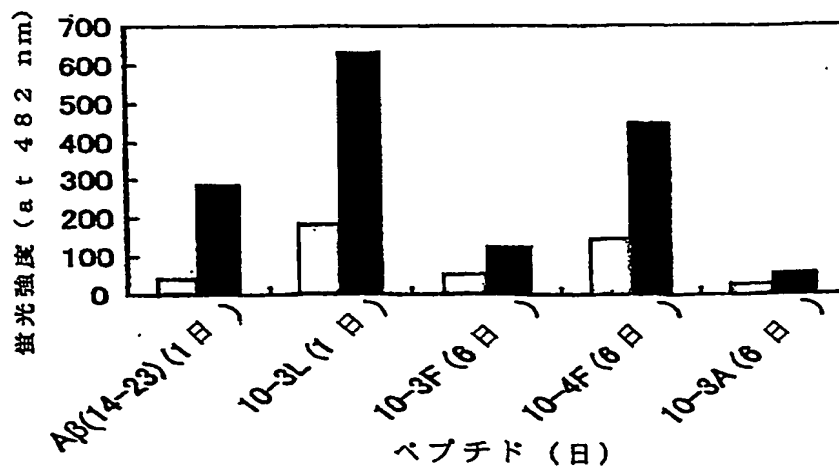
【図 3】



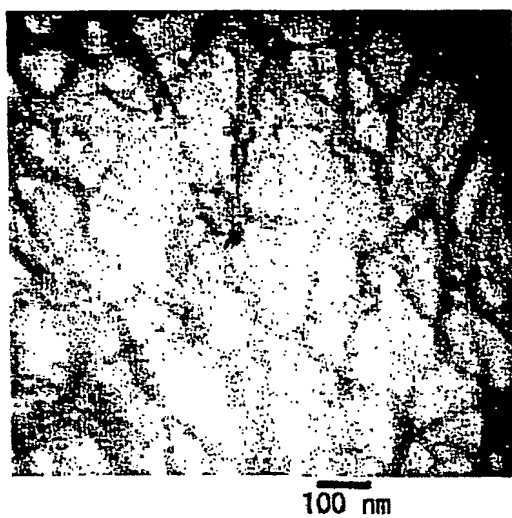
【図 4】



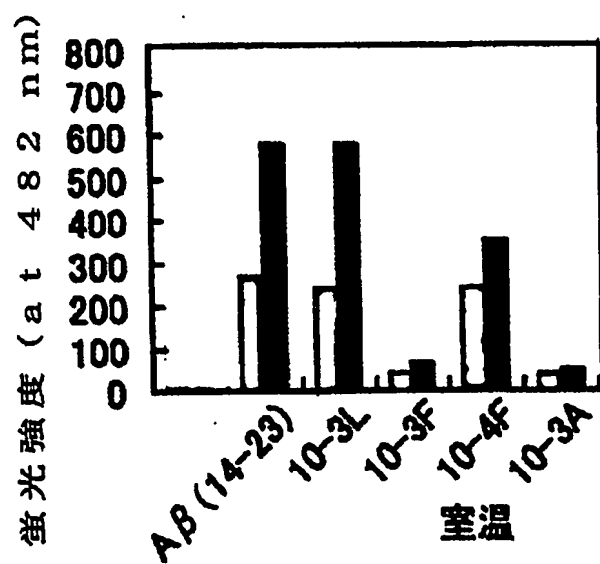
【図 5】



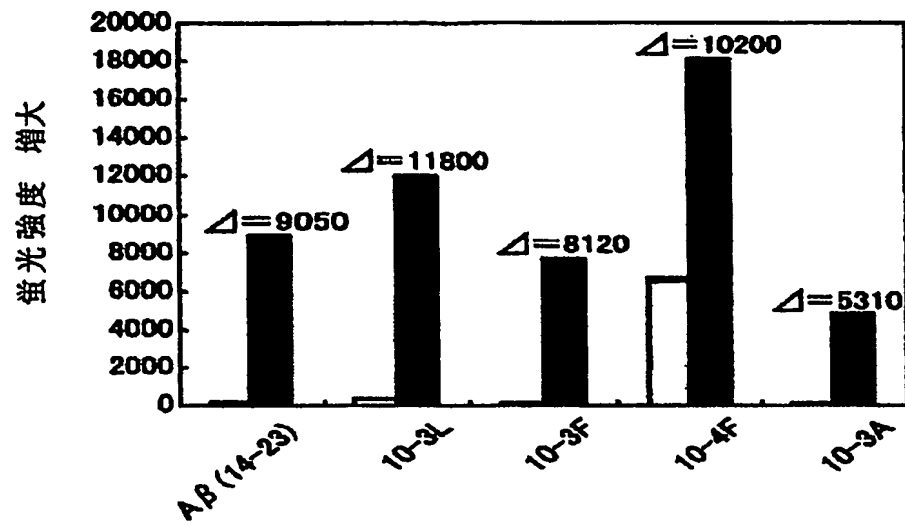
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 アミロイド線維化した微量のアミロイド β 蛋白質の核とテンプレート反応を起こしてアミロイド線維を形成し、線維を増量して増幅する天然ペプチドの探索、並びにそれに代り得る新たな人工ペプチドの設計、開発と、これらを用いたアミロイド β 蛋白質のアミロイド線維化増幅方法及びそれに用いる試薬、並びにアミロイドーシスに起因する疾病の検出方法及びそれに用いる試薬の提供。

【解決手段】 アミロイド β ペプチドの14残基から23残基からなるペプチド又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドを含んでなる試薬を用いるアミロイド β 蛋白質のアミロイド線維化増幅方法及びこれに用いる試薬、該ペプチドを含んでなる試薬を用いるアミロイドーシスに起因する疾病の検出方法及びこれに用いる試薬、並びにこれらに使用し得る新規な人工ペプチド。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003-295153
【承継人】
【識別番号】 503360115
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代表者】 沖村 憲樹
【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417

【提出物件の目録】
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
【物件名】 登記簿謄本 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2003-295153

出願人履歴情報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

特願 2003-295153

出願人履歴情報

識別番号

[503360115]

1. 変更年月日

2003年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構